

척수 손상 후 척수 및 척수외 수준의 Vitamin D₃ Up-regulated Protein 1 유전자 발현에 관한 연구

연세대학교 의과대학 마취통증의학교실,
충남대학교 의과대학 *해부학교실 및 †마취통증의학교실

심연희 · 이영호* · 이원형† · 윤석화† · 신용섭†

= Abstract =

Spinal and Supraspinal Changes in Vitamin D₃ Up-regulated Protein 1 (VDUP1) Gene Expression after Spinal Cord Injury

Yon Hee Shim, M.D., Young Ho Lee, M.D.*, Won Hyung Lee, M.D.†
Seok Hwa Yoon, M.D.†, and Yong Sup Shin, M.D.†

Department of Anesthesiology and Pain Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea,
Departments of *Anatomy and †Anesthesiology and Pain Medicine, College of Medicine,
Chungnam National University, Daejeon, Korea

Background: Vitamin D₃ up-regulated protein 1 (VDUP1) gene is known to be a novel member of the early response genes and an oxidative stress mediator. This study was designed to elucidate VDUP1 expression and its involvement in central sensitization after spinal cord injury (SCI).

Methods: Contusion injury was produced at spinal segment T10 (20 mm drop, 10 g rod) in adult male Sprague-Dawley rats (250-300 g). Withdrawal responses were measured using von Frey filaments and acetone on the 1st, 3rd and 7th days after SCI. The expressions of VDUP1 gene in the brain and in the cervical and lumbar spine were examined by immunohistochemistry on the 1st, 3rd and 7th day after SCI.

Results: VDUP1 gene was detected in a few oligodendrocytes in the spinal cord and in the brain of control rats. VDUP1 gene expression increased in most of the neurons and ependymal cells in the central canal of the injured (lumbar) spinal cord 1 day after SCI. This expression gradually decreased in majority of cells from day 1 to day 7 after SCI. VDUP1 gene expression was also observed to be increased 1 day after SCI, and gradually to decrease from 1 day to 7 days after SCI. The neurons in the intact (cervical) spinal cord VDUP1 gene expression increases maximally 3 days after SCI in the cerebral cortex and the thalamus. Neuropathic pain behavior was triggered by the plantar surface of the fore foot after SCI.

Conclusions: These results show that the VDUP1 gene may be an early modulator of transneuronal stress response after SCI, and to be related to the central sensitization of neuropathic pain behavior after SCI. (Korean J Anesthesiol 2003; 44: 255~264)

Key Words: Central sensitization; gene; neuropathic pain; spinal cord injury; vitamin D₃ up-regulated protein.

논문접수일 : 2003년 1월 22일

책임저자 : 신용섭, 대전광역시 중구 대사동 640, 충남대학교병원 마취통증의학과, 우편번호: 301-721

Tel: 042-220-7851, 7841 Fax: 042-220-7968, E-mail: ysshin@cnu.ac.kr

박사학위 논문임.

서 론

척추 손상은 환자로 하여금 평생 지속되는 고통을 가져오게 할 뿐만 아니라 가족과 넓게는 사회에까지 큰 영향을 끼친다. 특히, 척수 손상 후에는 신경병증성 통증, 자율신경계 실조 및 강직(spasticity) 등 치료하기 어려운 후유증이 나타난다.¹⁻³⁾

척수 손상시 신경세포와 신경아교세포(별아교세포, 희소돌기아교세포 및 미세아교세포)에서는 즉각적으로 많은 괴사(necrosis)가 일어난다. 최근에는 세포의 괴사 뿐만 아니라 세포사멸(apoptosis)이 나타난다는 것이 확인되어 세포사멸과 관련된 연구들이 시행되고 있으며,⁴⁻⁷⁾ 이차적으로 변성(degeneration)이 나타나 신경조직의 광범위한 손실이 초래된다.⁸⁻¹⁰⁾ 이와 같은 이차적인 신경 손상 반응은 여러 가지 신경화학적 변화를 초래해서 척수 신경 세포의 생리적인 상태를 변화시키며, 세포 독성적인 과정은 신경세포 세포질의 구성성분에 영향을 미쳐서 신경세포 손상과 관련된 유전자가 발현된다.^{4,5,11)}

척수에 강한 독성 자극이 가해지면 후각(posterior gray column or posterior horn)의 신경세포는 구조적, 기능적으로 탄력적인 변화가 나타난다.^{12,13)} 중추감작(central sensitization)은 유해성이 없는(innocuous) 또는 해로운(noxious) 자극에 대해 중추의 통증관련 신경세포들의 반응성이 증가된 상태를 말한다. 척수의 중추감작은 여러 가지 protein kinase의 효소 및 nitric oxide synthase, c-fos, c-AMP-responsive element-binding protein (CREB) 등 전사인자의 활성화에 의한 경우가 많다.¹⁴⁻¹⁸⁾

Vitamin D₃ up-regulated protein 1 (VDUP1) 유전자는 HL-60 세포주에서 vitamin D₃ 투여에 의해 증가됨으로써 알려진 유전자로^{19,20)} thioredoxin과 상호 반응한다. 이 유전자는 세포질에 존재하며 여러 가지 스트레스가 주어질 때에 강하게 발현이 유도된다. VDUP1 유전자는 산화 스트레스에 아주 민감하게 반응하는데 세포에서 산화환원(redox) 상태를 변화시킴으로써 스트레스에 반응하는 중요 조절물질이다.²¹⁻²³⁾

VDUP1은 정상 심장, 폐, 흉선, 신장, 비장, 고환 및 골격 근육에서는 비교적 많이 발현되지만, 뇌 등 정상 신경조직에서는 거의 발현되지 않는다.²¹⁾ 최근

에는 배양된 신경세포에 탈분극(depolarizing) 조건을 만들어 세포사멸(apoptosis)을 유도할 때 VDUP1이 빠르게 증가하며, VDUP1 유전자의 발현은 세포내로 Ca²⁺ 유입의 의해 조절된다고 보고되었다.²⁴⁾

척수 손상 후에 나타나는 신경병증성 통증은 손상 받은 부위뿐만 아니라 손상 받은 척수 수준의 상하에 해당되는 영역에도 나타난다.²⁵⁻²⁷⁾ 이와 같이 광범위한 통증과 관련된 이차적인 변화는 척수 및 통증 관련 중추신경계에 비정상적인 자극이 전달되어 중추감작이 일어난 데에 기인한 것이다.

본 연구자들은 예비실험에서 척수 손상 후 VDUP1 유전자 발현이 증가함을 확인하고, 앞발과 뒷발 사이 척수 수준에 척수 손상을 가하고, 이질통(allodynia) 또는 통각과민(hyperalgesia)이 앞발과 뒷발에 각각 나타나는지 확인하고, 손상 받은 척수 부위와 그 보다 상위의 손상 받지 않은 척수신경 및 뇌의 시상, 대뇌피질 체지각 영역에서의 VDUP1 유전자 발현을 확인하고자 본 실험을 시행하였다.

대상 및 방법

동물실험위원회의 승인을 얻은 후 Sprague Dawley 백서(수컷, 8주령, 250~300 g)를 사용하여 할로탄으로 흡입마취 하에 추궁절제(laminectomy)를 하였다. 경질막이 손상되지 않게 첫 번째에서 두 번째 요척수(L1-2) 수준에 해당하는 10번째 흉추(T10) 척추수준을 적출하였다. T10 추궁절제 후 10 g 쇠막대를 20 mm 높이에서 떨어뜨려 척추에 손상을 입히고 근육과 피부는 3-0 silk로 봉합하였다. 척수 손상 후 적당한 온도와 습도를 유지하면서, 물과 먹이를 충분히 제공하였다. 척수 손상을 가하지 않은 쥐를 정상 대조군으로 사용하였다.

척수 손상후 1일, 3일 및 7일째에 앞발 및 뒷발의 물리적 자극에 의한 통증을 측정하였다. 백서를 급속그물로 된 바닥에 올려놓고 8.4 mN에서 186.7 mN의 von Frey filaments (8.4, 13.5, 24.5, 54.4, 100.5 및 186.7 mN)로 발바닥을 자극하였다. von Frey filament를 양쪽 뒷다리 발바닥에 각각 10회 자극하여 회피하는 횟수를 기록했으며, 다리를 드는 빈도는 백분율로 나타내었다([다리를 든 회수 ÷ 총 시도횟수] × 100). Acetone은 피부에 닿았을 때 증발하면서 피부의 온도를 떨어뜨리기도 하지만 냉수와는 구별된

반응을 나타내는 화학적 물질이다. von Frey test 후에 acetone 용액으로 뒷다리 발바닥 자극실험을 실시하였다. Acetone은 5분 간격으로 5번 시행하여 acetone으로 자극한 다음 발을 급작히 회피하는 횟수를 기록하였고, 그 빈도는 백분율로 나타내었다.

척수 손상 후 1일, 3일, 7일에 각각 실험동물을 고통 없이 희생시켰다. 4% paraformaldehyde를 사용하여 관류고정을 실시하였으며, 조직 절취는 횡단면 (cross section)용과 수평 절단면(longitudinal section)용으로 구분하여 횡절단용은 손상부분의 조직을 절취하였고, 수평 절단용은 손상부분(T10)에서 한 단계 앞·뒤인 T9-T11번 척수 수준의 척수와 손상을 가하지 않은 경부 척수 및 뇌를 절취하였다. 적출한 조직은 4% paraformaldehyde용액에 24시간 동안 후 고정하고, 30% sucrose 용액에서 하루 밤 동안 담가 둔 후, 30 μ m 두께로 냉동 절편하여 phosphate buffered saline (PBS)이 들어 있는 24-well plate에 모았다.

VDUP1 antisense 및 sense riboprobe는 Sp6와 T7 promotor가 존재하는 pGEM-T vector (Promega)에 백서의 561 bp 크기의 cDNA를 집어넣어 제작하였다. VDUP1의 antisense probe 제작을 위해 Sal I을, sense probe를 위해 Nco I으로 linearization 한 후, Sp6/T7 polymerase와 10 mM digoxigenin-11-UTP (Roche)로 전사시켜 probe를 제작하였다.

1 \times PBS에 모아진 조직을 0.4% Tween X - 100/ 1 \times PBS에 실온에서 30분간, proteinase K 25 μ g/ml를 실온에서 20분, acetylation solution (0.25% acetic anhydride, 0.1 M triethanolamine, 0.9% NaCl)을 신선하게 제작하여 실온에서 30분, prehybridization solution (0.3 M NaCl, 50% deionized formamide, 20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 \times Denhardt's solution)을 실온에서 1시간 동안 incubation시켰다. Hybridization solution (0.5 mg/ml tRNA, 20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 2.5 mM EDTA, 1 \times Denhardt's solution, 0.3 M NaCl, 50% deionized formamide, 0.1% Tween 20, 0.5 μ g/ml digoxigenin-labeled VDUP1 antisense 또는 sense probes)은 55°C에서 진탕시키면서 하루 밤 동안 반응시켰다. Hybridized된 조직은 2 \times SSC/50% formamide로 55°C에서 1시간, RNase A 20 μ g/ml는 37°C에서 30분, 2 \times SSC/50% formamide에서 1시간, 0.5 \times SSC/50% formamide에서 55°C에서 1시간, 60°C에서 1시간 동안 수세한 후, anti-digoxigenin alkaline phosphatase

conjugated serum을 1 : 1000으로 희석하여 4°C에서 하루 밤 동안 반응시켰다. Coloring solution (NBT [nitroblue tetrazolium], BCIP [5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate])을 어두운 곳에 두고 30분 간격으로 확인하였다. 각각의 샘플은 gelatin-coated slide에 붙이고 0.5% methyl green으로 대조염색을 실시하였으며 coverslip으로 봉입하여 관찰하였다.

RT-PCR을 위해서 척수 및 뇌조직을 신속히 적출한 다음 RNA Zol B kit를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 DEPC가 처리된 증류수에 녹이고, 2 μ g 정도의 total RNA를 65°C에서 5분간 가열하여 denaturation 후 얼음에 급냉시켰다. RT buffer, dNTP, oligo-dT, RNase inhibitor, M-MLV reverse transcriptase를 적절히 가하고 42°C에서 1시간 반응시켜 template cDNA를 제작하였다. cDNA 산물을 99°C에서 5분간 가열 후 얼음에서 급냉 후 -70°C에 보관하였다. Polymerase chain reaction (PCR)은 DNA 3 μ l, 10 \times PCR buffer 5 μ l, 2.5 mM 4dNTP 4 μ l, forward primer (50 pmole/ μ l) 1 μ l, reverse primer (50 pM/ μ l) 1 μ l, 증류수 35.75 μ l, Taq DNA polymerase (5 U/ μ l) 0.25 μ l를 넣어 총 50 μ l 되게 하여 잘 혼합하였다 (forward primer, 5'-CAAGTTCGGCTTGAGCTTC-3'; reverse primer, 5'-TTCGAG-CCAGGGACACTAAC-3'). 반응이 일어나는 동안 반응 혼합액이 증발하지 않도록 반응 혼합액의 표면을 완전히 덮을 정도로 mineral oil을 한 방울을 떨어뜨렸다. Thermocycler를 이용하여 94°C에서 5분간 1주기를 시행한 후 94°C에서 1분, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 25주기를 반복

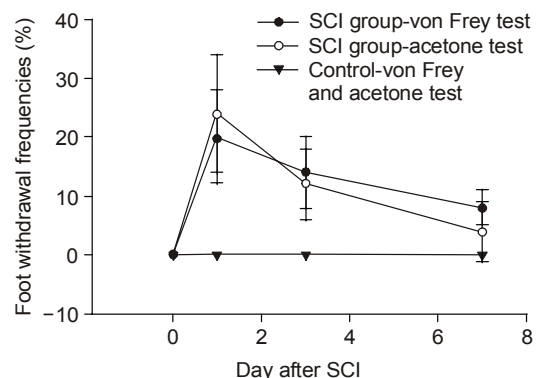


Fig. 1. Foot withdrawal frequencies with von Frey and acetone tests in the fore foot after spinal cord injury (SCI).

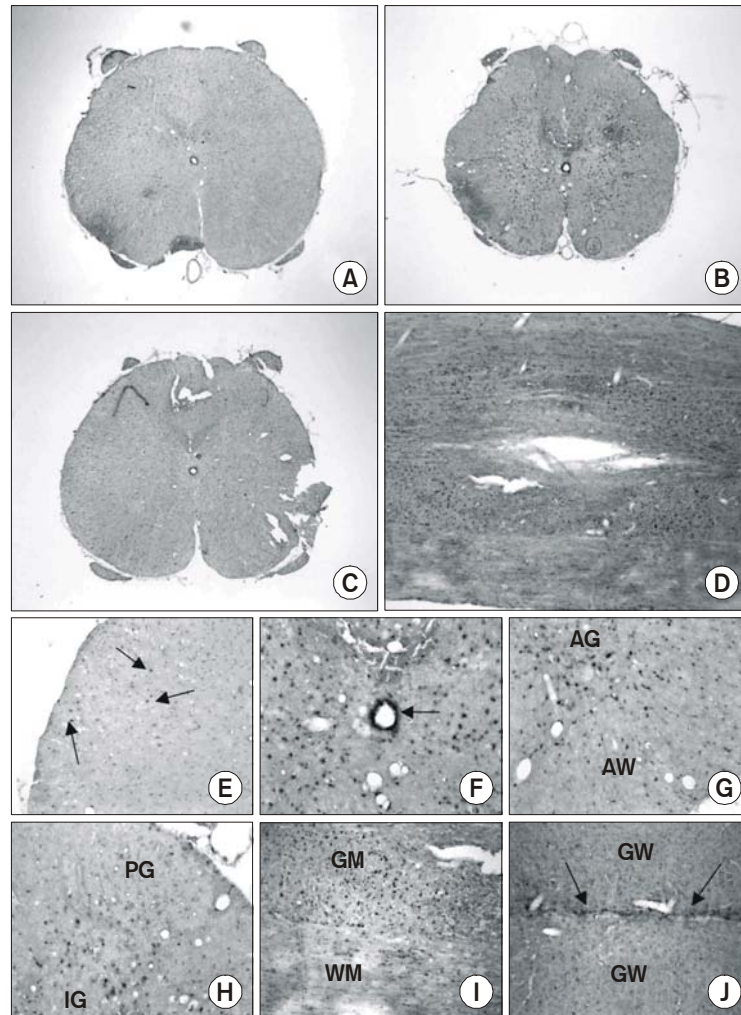


Fig. 2. Vitamin D₃ up-regulated protein 1 (VDUP1) gene expression in contused lumbar spinal cord after spinal cord injury (SCI). (A) The spinal cord of normal control rats, cross sectional view, $\times 40$ There was little expression of VDUP1 gene. (B) The spinal cord 1 day after SCI, cross sectional view, $\times 40$ VDUP1 gene expression increased significantly in most of the spinal cord. (C) The spinal cord 3 days after SCI, cross sectional view, $\times 40$ VDUP1 gene expression decreased in most of the spinal cord. (D) The spinal cord 1 day after SCI, longitudinal sectional view, $\times 40$ VDUP1 gene expressed in broad area around contused spinal cord. (E) The white matter in the spinal cord of normal rats, cross sectional view, $\times 200$. A few oligodendrocytes (arrows) express VDUP1 gene. (F) The gray matter around central canal (arrow) 1 day after SCI, cross sectional view, $\times 200$. A lot of neurons and most of ependymal cells in the central canal express VDUP1 gene. (G) The anterior gray and white columns 1 day after SCI, cross sectional view, $\times 200$. VDUP1 gene expression increase in most of motor neurons in anterior gray column (AG) and many oligodendrocytes in the anterior white column (AW). (H) The posterior gray column area 1 day after SCI, cross sectional view, $\times 200$. A few neurons express VDUP1 gene in posterior gray column (PG), and many neurons in the intermediate gray column (IG) express VDUP1 gene. (I) The spinal cord 1 day after SCI, longitudinal sectional view, $\times 100$. Most of neurons in gray matter (GM) and many oligodendrocytes in the white matter (WM) express VDUP1 gene. (J) The spinal cord around central canal (arrows) 1 day after SCI, longitudinal sectional view, $\times 100$. A lot of ependymal cells around contused spinal cord express VDUP1 gene (GW, gray matter).

수행하여 DNA를 증폭하였다. 증폭된 DNA를 회수하여 2% agarose gel에 전기영동 한 후 사진을 찍어 정량분석 하였다.

결 과

통증 행동검사 결과 앞발에서는 척수 손상을 받은 5마리의 쥐에서 von Frey 및 acetone test에 약하게 반응을 보이거나 반응하지 않아 경미한 이질통 또는 통각과민이 나타났다. 척수 손상을 받은 후 1일째부터 von Frey 및 acetone test에 반응을 보인 쥐는 척수 손상 후 7일째에도 빈도는 감소하였지만 계속 반응을 보였다(Fig. 1). 뒷발에서는 척수 손상을 받은 5마리의 쥐 모두 척수 손상 후 7일째까지도 통증이 나타나지 않았으며, 오히려 주사바늘에도 반응을 하지 않은 마비 현상이 나타났다. 마비 현상은 척수 손상 후 7일째에 회복되었다.

정상 척수 회백질의 신경세포에서는 VDUP1 유전자가 발현되지 않았으나, 백질의 일부 회소돌기아교세포에서 VDUP1 유전자가 발현되었다(Fig. 2A, E). 척수 손상 후 1일째에는 척수 전반에 걸쳐 현저한 VDUP1 유전자의 증가가 나타났다(Fig. 2B). 척수 손상 후 1일째에 중심관 주변의 신경세포에서 VDUP1 유전자가 현저히 증가하였으며(Fig. 2F, J), 전각, 전각과 후각 사이 지역의 신경세포에서는 VDUP1 유전자가 증가하였으나(Fig. 2B, G, H), 후각에서는 일부의 신경세포에서만 VDUP1 유전자가 증가하였다(Fig. 2B, H). 척수 손상후 1일째의 손상받은 부위의 백질인 전섬유단(anterior fasciculus), 측섬유단(lateral fasciculus) 및 후섬유단(posterior fasciculus)에 있는 회소돌기아교세포에서 VDUP1 유전자가 증가하였다(Fig. 2D, G, I). 정상 척수의 중심관 뇌막실세포에서는 VDUP1 유전자가 발현되지 않았지만, 척수 손상 후 1일째에는 중심관의 광범위한 부위에 있는 뇌실

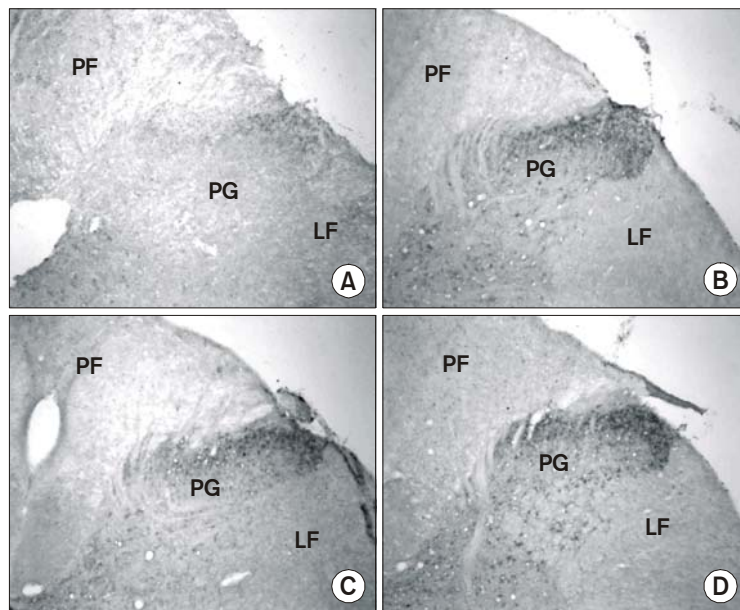


Fig. 3. Vitamin D₃ up-regulated protein 1 (VDUP1) gene expression in the gray column of spinal cord after spinal cord injury (SCI), cross sectional view, $\times 100$ (PG; posterior gray column, PF; posterior fasciculus, LF; lateral fasciculus). (A) The posterior gray column of normal control rats. There were no cells express VDUP1 gene. (B) The posterior gray column 1 day after SCI. The cells in the lamina I, II, and III (arrow) express VDUP1 gene. (C) The posterior gray column 3 days after SCI. The cells in the lamina I, II, and III (arrow) express VDUP1 gene. (D) The posterior gray column 7 days after SCI. The cells in the lamina I, II, and III (arrow) express VDUP1 gene.

막세포에서 VDUP1 유전자의 발현이 증가하였다(Fig. 2A, B, F, J).

경부의 정상 척수 후극 부분에는 VDUP1 유전자의 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 3A). 척수 손상 후 1일째부터 후극의 lamina I, II 구역에 VDUP1 유전자의 발현이 증가하여(Fig. 3B), 척수 손상 후 3일, 7일째에도 계속 척수 후극의 lamina I, II 및 III 구역에서 VDUP1 유전자의 발현이 증가되어 있었다(Fig. 3C, D).

척수 손상을 받지 않은 정상 뇌의 시상은 VDUP1 유전자가 발현되지 않았다(Fig. 4A). 척수 손상 후 1일째에 VDUP1 유전자가 시상 전영역에서 약하게 발현되었다(Fig. 4B). 척수 손상 후 3일째에 VDUP1의 유전자 발현이 증가하였다가(Fig. 4C), 척수 손상 후 7일째에는 VDUP1 유전자의 발현이 다시 감소하였다(Fig. 4D).

척수 손상을 받지 않은 정상 쥐의 두정엽에서는 VDUP1 유전자가 발현되지 않았다(Fig. 5A). 척수 손

상 후 1일째에는 VDUP1 유전자가 두정엽 내측 영역의 신경세포에서 발현되기 시작하였다(Fig. 5B). 척수 손상 후 3일째에는 VDUP1 유전자를 발현하는 신경세포들이 두정엽의 전영역에 걸쳐 현저히 증가하였다(Fig. 5C). 척수 손상 후 7일째에는 VDUP1 유전자 발현이 다시 감소하여 척수 손상 후 3일경과 유사한 양상을 나타냈다(Fig. 5D). Fig. 6E는 해마의 치아이랑(dentate gyrus) 및 CA1과 CA3 구역의 모양으로 보아 본 실험에서 관찰한 대뇌피질이 두정엽임을 나타내 주며, 두정엽은 주로 체지각영역들이 차지하고 있어, 척수 손상 후 대뇌 피질의 체지각 영역의 신경세포들에서 VDUP1 유전자가 증가하였음을 알 수 있었다.

척수(손상 받은 부위와 손상 받은 부위의 척수 윗부분을 모두 포함) 및 뇌조직(대뇌피질과 시상이 포함된 전체 뇌조직)에서 RT-PCR에 의한 VDUP1 유전자 발현 양상을 관찰하였다. 정상에서 보다 척수 손상 후 1일 및 3일째에 VDUP1 유전자가 증가하였다

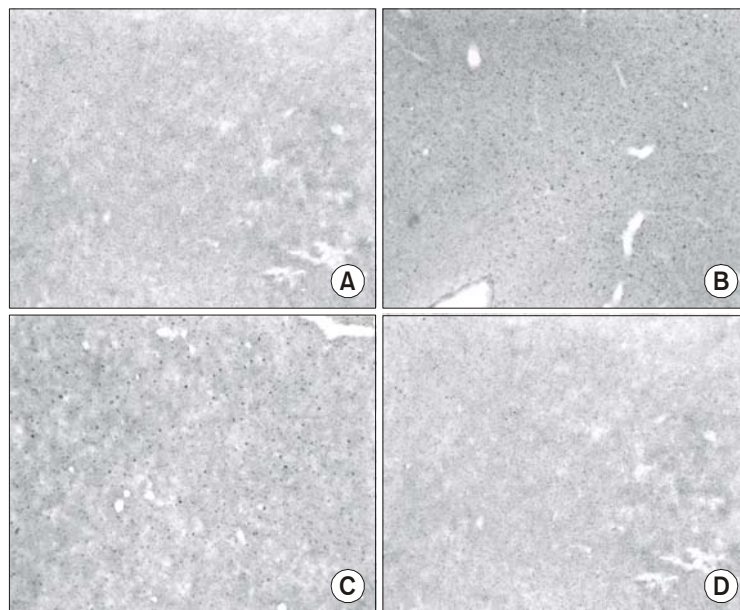


Fig. 4. Vitamin D₃ up-regulated protein 1 (VDUP1) gene expression in the thalamus after spinal cord injury (SCI), coronal sectional view, $\times 100$. (A) The thalamus of normal control rats. There were no cells express VDUP1 gene. (B) The thalamus 1 day after SCI. VDUP1 gene is expressed weakly in many cells in the thalamus. (C) The thalamus 3 days after SCI. VDUP1 gene is expressed moderately in many cells in the thalamus. (D) The thalamus 7 days after SCI. VDUP1 gene is expressed minimally in cells in the thalamus.

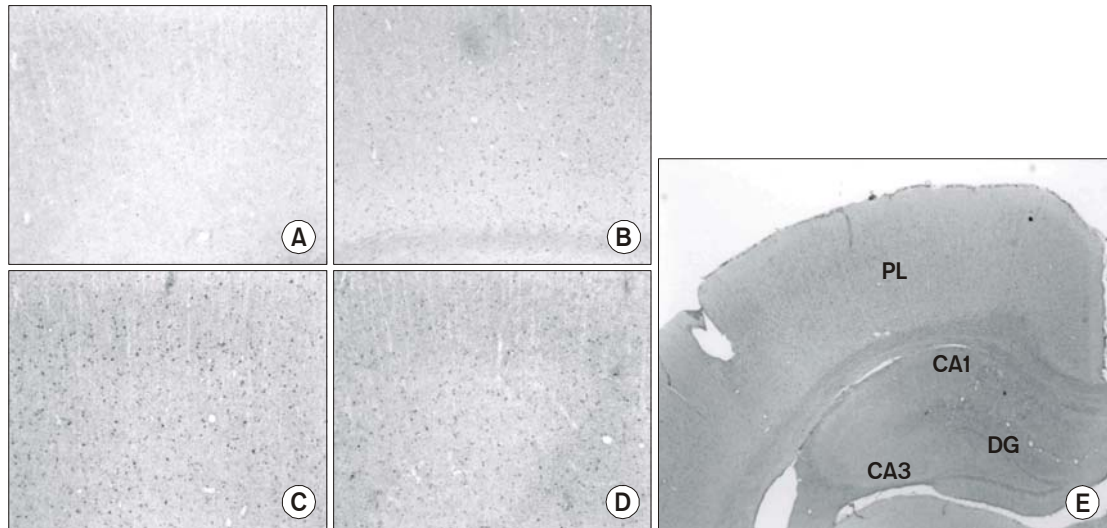


Fig. 5. Vitamin D₃ up-regulated protein 1 (VDUP1) gene expression in parietal lobe of the cerebral cortex after spinal cord injury (SCI), coronal sectional view. (A) The parietal lobe of normal control rats, $\times 100$. There are no VDUP1 gene positive cells in the parietal cortex. (B) The parietal lobe 1 day after SCI, $\times 100$. Many cells in the inner layer of the parietal cortex express VDUP1 gene. (C) The parietal lobe 3 days after SCI, $\times 100$. A lot of cells in all layer of the parietal cortex express VDUP1 gene. (D) The parietal lobe 7 days after SCI, $\times 100$. Many cells in all layer of the parietal cortex express VDUP1 gene, however, the number of VDUP1 gene positive cells is less than that on 3 days after SCI. (E) The brain 3 days after SCI, $\times 40$. The shape of the hippocampus (DG; dentate gyrus) represent that cerebral cortex is parietal lobe (PL) consist of somatosensory cortex.

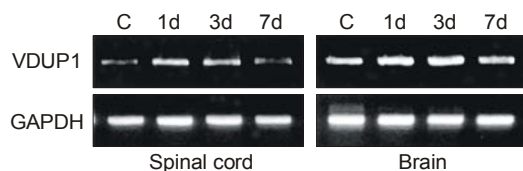


Fig. 6. Vitamin D₃ up-regulated protein 1 gene expression in the spinal cord and brain (C, spinal cord of normal control rats; 1d, 1 day after spinal cord injury (SCI); 3d, 3 days after SCI; 7d, 7 days after SCI).

가 척수 손상 후 7일째에는 다시 감소하는 양상을 보여 in situ hybridization 결과와 유사한 소견을 나타내었다(Fig. 6).

고 찰

본 연구 결과 척수 손상 후 손상 받은 척수 부위에서 손상 후 1일째에 VDUP1 유전자의 발현이 현저히 나타났다가 손상 후 3일째부터 다시 감소하였

음을 확인하였고, 손상된 척수의 윗부분인 경부 척수에서는 척수 손상 후 1일째부터 계속적으로 후극의 신경세포에서 증가가 된 상태를 유지하였으며, 뇌의 시상 및 대뇌피질 두정엽의 신경세포에서는 손상 후 1일째부터 VDUP1 유전자가 증가하여 손상 후 3일째에 가장 많이 발현되었으며 손상 후 7일째에는 다시 감소하는 양상을 보였다. 척수 손상 후 신경병증성 통증에 대한 행동검사를 한 결과 뒷발에서는 신경병증성 통증을 관찰할 수 없었고 앞발에서는 이질통 또는 통각과민이 나타났다.

VDUP1 유전자는 세포에서 산화환원을 상태를 조절하여 스트레스에 반응하는 중요 조절인자로 알려졌다^{21-23,28} 신경세포에서도 세포사멸과 관련되어 VDUP1이 발현된다고 보고되었다.²⁴ 척수 손상 시 VDUP1 유전자가 물리적인 손상인 강한 스트레스가 주어지기 때문에 척수조직에서 발현이 증가될 것이라는 예상대로 본 실험에서도 척수 손상 후 손상을 준 부위를 중심으로 넓은 구역의 신경세포 및 희소돌기아교세포에서 증가되었다. 세포사멸이 척수 손

상 후 1일째에는 손상을 가한 부위에 국한되어 나타나지만 척수 손상 후 7일째부터는 손상을 가한 곳으로부터 멀리 떨어진 부위의 백질에 있는 회소돌기아교세포 및 희백질의 신경세포에까지 세포사멸이 나타났다.^{5,29)} 이러한 현상은 척수 손상시 신경세포의 축삭이 변성되고 이어 축삭으로부터의 생존신호의 소실에 의한 것일 수 있으며,³⁰⁾ 손상된 부위로부터 사이토카인 등 염증과 관련된 물질들이 유리되어 먼 곳까지 영향을 미쳐³¹⁾ 손상 받은 부위로부터 먼 척수에서도 세포사멸이 일어날 것이라고 하였다.

본 연구에서 VDUP1 유전자는 손상 받은 부위는 물론 손상 받지 않은 경부 척수의 후각에서도 증가하였다. 이는 척수 손상시 백질의 회소돌기아교세포에서 세포사멸이 일어남에 따라⁵⁾ 경부의 백질인 후섬유단과 축섬유단에 있는 축삭 및 회소돌기아교세포들의 손상에 의해 인접한 후각의 신경세포들에 스트레스가 가해져 VDUP1 유전자의 발현이 증가되었다고 사료된다. 또한, 본 실험에서 경부 척수 전각, 후각과 전각 사이 신경세포에서도 VDUP1 유전자의 발현이 증가됨을 확인하였다. 요척수(L1-L2 수준) 손상시 손상받은 부위의 윗부분인 경부 척수의 후극 특히 lamina I, II 및 III 부위에서도 증가하였다. 그 중에서, lamina II는 아교질(substantia gelatinosa)을 이루고 있는 부위로 통증 전달에 관여하는 세포들이 존재하며 이곳의 세포들이 활성화 되면 통증에 민감해져 신경병증성 통증이 나타날 수 있다. 본 연구에서도 실험동물의 앞다리에 이질통이나 통각 과민이 나타나 통증에 반응성이 증가되는 중추감작이 일어났음을 확인하였다. 임상적인 연구를 발표한 예에서, 흉부의 척수 손상 환자 8명중 3명에서 경부의 신경병증성 통증이 나타났으며, 요부의 척수 손상 환자 2명 중 1명에서 경부에 통증이 나타났다고 하였다.³⁾ 본 연구는 이와 같은 척수 손상시의 중추감작에 의한 통증을 설명하는데 중요한 단서를 제공할 것으로 본다.

실험동물에서 척수 손상 시 뇌의 시상 및 대뇌피질의 두정엽 신경세포들에서 VDUP1 유전자가 발현되었다. 반면에 VDUP1 유전자는 뇌의 해마 및 시상하부에서는 발현되지 않았다. 대뇌피질의 두정엽은 체지각 영역이고 시상은 감각 신호가 모이는 곳으로^{32,33)} 척수 손상에 의한 비정상적인 감각신호가 계속적으로 시상 및 대뇌피질 두정엽에 전달되어 VDUP1 유

전자의 발현이 증가되었다고 추정된다. 특히, 뇌의 해마 및 시상하부 등에서는 VDUP1 유전자 발현이 증가되지 않은 것으로 보아 체지각과 관련 없는 부분은 스트레스를 받지 않아 VDUP1 유전자의 발현이 나타나지 않았으며, 뇌의 두정엽 및 시상의 대부분의 영역에 걸쳐 신경세포에서 VDUP1 유전자가 증가된 것은 신경세포간의 스트레스에 대한 반응이 인접한 신경세포에도 전달된 것에 기인한 것으로 본다.

척수에 quisqualic acid를 주입하여 신경병증성 통증을 유발시킨 후 척수 및 뇌의 시상 및 대뇌 두정엽에서 preproenkephalin 및 preprodynorphin 등의 opioid peptide의 발현을 관찰한 결과 척수 손상 후 두 opioid peptide가 증가되었으며, 특히 신경병증성 통증이 적게 나타난 쥐의 시상 및 두정엽에서 발현이 현저하다는 보고에 따라,^{8,9)} 척수 손상 후 비정상적인 통증이 나타나는 것은 체내의 opioid peptide 발현이 잘 되지 않는데 기인한다는 주장이 제시되었다.⁹⁾ 본 실험에서도 척수, 뇌의 시상 및 두정엽에서 대부분 VDUP1 유전자의 발현이 증가되었다. 본 실험에서 앞발에서의 통증은 약하게 나타났으며, 일부 쥐에서는 신경병증성 통증이 전혀 나타나지 않은 것은 체내의 opioid peptide 발현의 정도와 관련이 있을 것으로 본다.

척수 손상 시 통증의 발생은 손상의 정도에 따라 달라진다.³⁴⁻³⁶⁾ 본 연구에서는 10 g의 막대기로 20 mm 높이에서 떨어뜨리는 비교적 심한 손상을 척수에 가하였다. 그 결과 뒷발에서는 척수 손상을 받은 쥐 다섯마리 모두에서 통증 행동검사에 대한 반응을 보이지 않았을 뿐만 아니라 주사바늘로 뒷발의 발바닥을 찔러도 잘 반응하지 않는 운동신경 마비가 나타났다. 이는 손상을 받은 아래 부분의 척수 쪽으로 가는 감각 또는 운동신경이 손상을 입어 뒷다리의 운동 또는 감각 마비가 초래된 것으로 본다.

척수손상 후 통증은 물론 체위성 저혈압, 자율신경계 실조 등의 자율신경과 관련된 후유증 및 정맥성 혈전(venous thrombosis), 폐렴 및 우울증 등 다양한 증상이 나타날 수 있다.³⁷⁻³⁹⁾ 이러한 후유증은 손상 받은 척수 부분은 물론 뇌의 시상과 대뇌피질에 이르는 광범위한 신경세포의 중추감작에 의한 것일 수 있다. 특히 본 연구는 척수 손상을 받은 위 수준의 영역에서 나타나는 다양한 부작용을 설명할 수

있는 중요한 시발점이 될 수 있다.

최근에 신경 손상 시 vitamin D hormone (VDH; 1,25-dihydroxyvitamin D₃)을 투여하면 L-type calcium channel의 발현을 억제하는 등의 기전으로 신경세포를 보호한다는 사실이 밝혀졌다.⁴⁰⁻⁴²⁾ VDUP1이 VDH 투여에 의해 증가된다는 점을 감안하면, VDUP1은 세포 손상 신호를 받아 신경세포 내로 calcium이 유입되어 세포의 흥분성이 높아짐에 의한 중추감작 상태에 대한 보상 작용으로 증가하였을 가능성이 있다. 즉 VDUP1 유전자의 발현이 중추감작의 원인이 아니고 오히려 중추감작에서 벗어나고 신경세포를 보호하기 위한 이차적인 대응산물일 수 있다. 이를 검증하기 위해서는 VDUP1 과발현세포주에서 신경세포 반응과 VDUP1 knock-out 쥐에서 척수 손상을 주었을 때의 척수의 변화 양상 및 통증 등 행동양상을 면밀하게 검토할 필요가 있다.

척수 손상 시 VDUP1 유전자의 발현과 중추감작에서의 역할을 규명하기 위하여, 척수 손상 후 신경병증성 통증 행동 검사 및 척수와 뇌에서 VDUP1에 대한 in situ hybridization과 RT-PCR을 실시한 결과 VDUP1 유전자는 척수 손상 시 이어진 신경세포에 지속적으로 가해지는 스트레스에 반응하여 증가하는 세포내 초기 조절인자이며, 척수 손상 시 신경병증성 통증의 한 기전으로 여겨지는 중추감작과 관련되어 있다고 본다.

참 고 문 헌

- Burchiel KM, Hsu FP: Pain and spasticity after spinal cord injury. *Spine* 2001; 26: 146-60.
- Defrin R, Ohry A, Blumen N, Urca G: Pain following spinal cord injury. *Spinal Cord* 2002; 40: 96-7.
- Cariga P, Ahmed S, Mathias CJ, Gardner BP: The prevalence and association of neck (coat-hanger) pain and orthostatic (postural) hypotension in human spinal cord injury. *Spinal Cord* 2002; 40: 77-82.
- Li GL, Brodin G, Farooque M, Funa K, Holtz A, Wang WL, et al: Apoptosis and expression of Bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord. *Exp Neurol* 1996; 55: 280-9.
- Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, McDonald JW, et al: Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 1997; 17: 5395-406.
- Shuman SL, Bresnahan JC, Beattie MS: Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats. *J Neurosci Res* 1997; 50: 798-808.
- Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS: Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nature Med* 1997; 3: 73-6.
- Abraham KE, McGinty JF, Brewer KL: The role of kainic acid/AMPA and metabotropic glutamate receptors in the regulation of opioid mRNA expression and the onset of pain-related behavior following excitotoxic spinal cord injury. *Neuroscience* 2001; 104: 863-74.
- Abraham KE, McGinty JF, Brewer KL: Spinal and supraspinal changes in opioid mRNA expression are related to the onset of pain behaviors following excitotoxic spinal cord injury. *Pain* 2001; 90: 181-90.
- Yerzierski RP, Santana M, Park SH, Madson PW: Neuronal degeneration and spinal cavitation following intraspinal injections of quisqualic acid in the rat. *J Neurotrauma* 1993; 10: 445-56.
- Grossman SD, Wolfe BB, Yasuda RP, Wrathall JR: Alterations in AMPA receptor subunit expression after experimental spinal cord contusion injury. *J Neurosci* 1999; 19: 5711-20.
- Willis WD: Mechanism of central sensitization of nociceptive dorsal horn neurons. In: *Spinal cord plasticity: alterations in reflex function*. Edited by Patternson MM, Grau JW: New York, Kluwer Academic. 2001, pp 127-45.
- Fang L, Wu J, Lin Q, Willis WD: Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II contributes to spinal cord central sensitization. *J Neurosci* 2002; 22: 4196-204.
- Lin Q, Peng YB, Willis WD: Possible role of protein kinase C in the sensitization of primate spinothalamic tract neurons. *J Neurosci* 1996; 16: 3026-34.
- Lin Q, Peng YB, Wu J, Willis WD: Involvement of cGMP in nociceptive processing by and sensitization of spinothalamic neurons in primates. *J Neurosci* 1997; 17: 3293-302.
- Wu J, Fang L, Lin Q, Willis WD: Fos expression is induced by increased nitric oxide release in rat spinal cord dorsal horn. *Neuroscience* 2000; 96: 351-7.
- Wu J, Fang L, Lin Q, Willis WD: Nitric oxide synthase in spinal cord central sensitization following intradermal injection of capsaicin. *Pain* 2001; 94: 47-58.
- Ji RR, Rupp F: Phosphorylation of transcription factor CREB in rat spinal cord after formalin induced hy-

- peralgesia: relationship to c-fos induction. *J Neurosci* 1997; 17: 1776-85.
19. Chen KS, DeLuca HF: Isolation and characterization of a novel cDNA from HL-60 cells treated with 1,25-dihydroxyvitamin D-3. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1219: 26-32.
20. Yamanaka H, Maehira F, Oshiro M, Asato T, Yanagawa Y, Takei H, et al: A possible interaction of thioredoxin with VDUP1 in HeLa cells detected in a yeast two-hybrid system. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 271: 796-800.
21. Junn E, Han SH, Im JY, Yang Y, Cho EW, Um HD, et al: Vitamin D₃ up-regulated protein 1 mediates oxidative stress via suppressing the thioredoxin function. *J Immunol* 2000; 164: 6287-95.
22. Nishiyama A, Matsui M, Iwata S, Hirota K, Masutani H, Nakamura H, et al: Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D₃ up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *J Biol Chem* 1999; 274: 21645-50.
23. Wang Y, De Keulenaer GW, Lee RT: Vitamin D₃ up-regulated protein-1 is a stress-responsive gene that regulates cardiomyocyte viability through interaction with thioredoxin. *J Biol Chem* 2002; 277: 26496-500.
24. Saito T, Tanaka S, Koike T: Rapid induction and Ca²⁺ influx-mediated suppression of vitamin D₃ up-regulated protein 1 (VDUP1) mRNA in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *J Neurochem* 2001; 78: 1267-76.
25. Vierck CJ Jr, Siddall P, Yeziarski RP: Pain following spinal cord injury: animal models and mechanistic studies. *Pain* 2000; 89: 1-5.
26. Drew GM, Siddall PJ, Duggan AW: Responses of spinal neurons to cutaneous and dorsal root stimuli in rats with mechanical allodynia after contusive spinal cord injury. *Brain Res* 2001; 893: 59-69.
27. Siddall PJ, Taylor DA, Cousins MJ: Classification of pain following spinal cord injury. *Spinal Cord* 1997; 35: 69-75.
28. Nishinaka Y, Masutani H, Nakamura H, Yodoi J: Regulatory roles of thioredoxin in oxidative stress-induced cellular responses. *Redox Rep* 2001; 6: 289-95.
29. Taoka Y, Okajima K: Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol* 1998; 56: 341-58.
30. Barres BA, Raff MC: Proliferation of oligodendrocyte precursor cells depends on electrical activity in axons. *Nature* 1993; 361: 258-60.
31. Hsu CY, Dimitrijevic MR: Methylprednisolone in spinal cord injury: the possible mechanism of action. *J Neurotrauma* 1990; 7: 115-9.
32. Paxinos G, Watson C: The rat brain in stereotaxic coordinates. 3rd ed. San Diego, Academic Press. 1997, pp 27.
33. Snell HS: Clinical neuroanatomy for medical students. 5th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 1992, pp 71.
34. Beric A: Post-spinal cord injury pain states. *Pain* 1997; 72: 295-8.
35. Demirel G, Yilmaz H, Gencosmanoglu B, Kesiktas N: Pain following spinal cord injury. *Spinal Cord* 1998; 36: 25-8.
36. Bethea JR, Nagashima H, Acosta MC, Briceno C, Gomez F, Marcillo AE, et al: Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor- α production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 1999; 16: 851-63.
37. McKinley WO, Tewksbury MA, Godbout CJ: Comparison of medical complications following nontraumatic and traumatic spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* 2002; 25: 88-93.
38. Jones NA, Jones SD: Management of life-threatening autonomic hyperreflexia using magnesium sulphate in a patient with a high spinal cord injury in the intensive care unit. *Br J Anaesth* 2002; 88: 434-8.
39. Jacob JE, Pniak A, Weaver LC, Brown A: Autonomic dysreflexia in a mouse model of spinal cord injury. *Neuroscience* 2001; 108: 687-93.
40. Brewer LD, Thibault V, Chen KC, Langub MC, Landfield PW, Porter NM: Vitamin D hormone confers neuroprotection in parallel with downregulation of L-type calcium channel expression in hippocampal neurons. *J Neurosci* 2001; 21: 98-108.
41. Garcion E, Wion-Barbot N, Montero-Menei CN, Berger F, Wion D: New clues about vitamin D functions in the nervous system. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13: 100-5.
42. Wang JY, Wu JN, Cherng TL, Hoffer BJ, Chen HH, Borlongan CV, et al: Vitamin D₃ attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in rats. *Brain Res* 2001; 904: 67-75.